

☆ XXXX ☆

电针对穴“迎香-合谷”通过IL-33/ST2通路调控 ILC2s改善大鼠过敏性鼻炎的机制研究

吴 涵¹, 吕 恒¹, 张 浩¹, 胡志祥¹, 李 蕾^{1,2}, 翟春涛¹, 吕玉娥^{1,2}
(¹山西中医药大学, 山西晋中 030600; ²山西省针灸医院, 太原 030006)

【摘要】 目的:观察电针对穴“迎香-合谷”对过敏性鼻炎(AR)大鼠鼻黏膜中白细胞介素(IL)-33/生长刺激表达基因2蛋白(ST2)信号通路及第2组先天淋巴细胞(ILC2s)的调控作用,探讨其对AR的治疗作用机制。方法:SD大鼠随机分为空白组(12只)和造模组(36只)。采用卵清蛋白(OVA)致敏建立AR模型。造模成功的36只大鼠随机分为模型组(12只)、西药组(12只)和电针组(12只)。电针组予针刺对穴“迎香-合谷”,同侧“迎香”和“合谷”连接电针仪,疏密波、频率2 Hz/100 Hz、电流强度1~2 mA,留针20 min;西药组予氯雷他定灌胃0.1 mg/100 g。各组干预均1次/d,连续14 d。于造模前、后及干预后,观察大鼠鼻部过敏症状(挠鼻、喷嚏、流涕)并记录评分。于干预结束后,HE染色观察大鼠鼻黏膜组织病理形态改变;ELISA法检测大鼠血清卵清蛋白特异性免疫球蛋白E(OVA-sIgE)、IL-9、IL-13含量;免疫荧光染色法双染检测大鼠鼻黏膜组织中ST2、胸腺细胞抗原1(Thy1,又称CD90)阳性表达及ILC2s数量;实时荧光定量PCR法检测大鼠鼻黏膜组织GATA结合蛋白3(GATA3)、维甲酸相关孤儿受体 α (ROR- α)、IL-33、ST2、IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)、髓样分化初级反应蛋白88(MyD88)、IL-1受体相关激酶4(IRAK4)、核因子 κ B p65亚基(NF- κ B p65)mRNA表达水平;Western blot法检测大鼠鼻黏膜组织中IL-33、ST2、MyD88蛋白表达水平。结果:OVA致敏后,与空白组比较,造模组大鼠鼻部过敏症状评分显著升高(均 >5 分, $P<0.001$),提示造模成功。干预后,与空白组比较,模型组鼻部过敏症状评分仍持续居高($P<0.001$);HE染色显示鼻黏膜屏障破坏,炎症反应显著;血清OVA-sIgE、IL-9、IL-13水平显著升高($P<0.001$);鼻黏膜ILC2s数量显著增加($P<0.001$),ST2和Thy1的荧光强度均增加($P<0.001$),GATA3、ROR- α 、IL-33、ST2、IL-1RAcP、MyD88、IRAK4、NF- κ B p65 mRNA表达水平均升高($P<0.001$, $P<0.01$),IL-33、ST2、MyD88蛋白表达水平均升高($P<0.001$)。与模型组比较,电针组与西药组鼻部过敏症状评分均降低($P<0.001$);HE染色显示鼻黏膜炎症反应浸润减轻,组织结构完整性改善;血清OVA-sIgE、IL-9、IL-13水平均下调($P<0.01$, $P<0.001$),鼻黏膜ILC2s数量减少($P<0.001$),ST2和Thy1的荧光强度降低($P<0.001$, $P<0.01$),GATA3、ROR- α 、IL-33、ST2、IL-1RAcP、MyD88、IRAK4、NF- κ B p65 mRNA水平显著下调($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.05$),IL-33、ST2、MyD88蛋白表达显著降低($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.05$)。电针组与西药组所有指标的差异均无统计学意义。结论:“迎香-合谷”对穴电针可以改善OVA诱导的AR大鼠鼻黏膜炎症反应改变,其作用可能是通过抑制鼻黏膜IL-33/ST2信号通路,下调ILC2s表达实现的。

【关键词】 过敏性鼻炎;电针;对穴;迎香-合谷;IL-33/ST2;ILC2s

Mechanism of electroacupuncture at “Yingxiang-Hegu” (LI20-LI4) acupoints ameliorating allergic rhinitis in rats via modulating ILC2s through the IL-33/ST2 pathway

Wu Han¹, Lü Heng¹, Zhang Hao¹, Hu Zhixiang¹, Li Lei^{1,2}, Zhai Chuntao¹, Lü Yu'e^{1,2} (¹Shanxi University of Chinese

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251213

引用格式:吴涵,吕恒,张浩,等.电针对穴“迎香-合谷”通过IL-33/ST2通路调控ILC2s改善大鼠过敏性鼻炎的机制研究[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-11.

项目来源:中国中医科学院科技创新工程项目(No. CI2022E010XB);吕景山国医大师“对法”传承省技术创新中心项目(No. 2022D100089052823242891545041);山西省科技人才创新团队建设项目(No. 202204051002011);山西省中医药管理局科研课题(No. 2023ZYB047);山西中医药大学创新团队项目(No. 2022TD1006)

共同通信作者:翟春涛, E-mail:709966203@qq.com

吕玉娥, E-mail:2768770577@qq.com

Medicine, Jinzhong 030600, Shanxi Province, China; ²Shanxi Acupuncture Hospital, Taiyuan 030006)

【ABSTRACT】 Objective To investigate the regulatory effects of electroacupuncture at “Yingxiang-Hegu” (LI20-LI4) acupoints on the interleukin (IL)-33/growth stimulation expressed gene 2 (ST2) signaling pathway and type 2 innate lymphoid cells (ILC2s) in the nasal mucosa of allergic rhinitis (AR) rats, and to explore its therapeutic mechanism for AR. **Methods** Forty-eight SD rats were randomly divided into a control group ($n=12$) and a modeling group ($n=36$). Ovalbumin (OVA)-induced AR model was established. Thirty-six successfully modeled rats were further randomized into a model group ($n=12$), a western medicine group ($n=12$), and an electroacupuncture group ($n=12$). The electroacupuncture group received acupuncture at the paired points “Yingxiang-Hegu”(LI20-LI4) with the ipsilateral LI20 and LI4 points connected to an electroacupuncture device. Stimulation parameters were set as follows: sparse-dense wave, frequency 2 Hz /100 Hz, current intensity 1–2 mA, needle retention for 20 min. The western medicine group received oral administration of loratadine (0.1 mg/100 g). Interventions were administered once daily for 14 consecutive days in all groups. Nasal allergy symptoms (nose scratching, sneezing and nasal discharge) were observed and scored before and after modeling, as well as after intervention. After intervention, histopathological change in the nasal mucosal tissue was examined via hematoxylin and eosin (HE) staining. ELISA was used to detect serum ovalbumin-specific immunoglobulin E (OVA-sIgE), IL-9, and IL-13 levels. Immunofluorescence double staining was used to assess ST2 and thymic cell antigen 1 (Thy1, also known as CD90) positive expression and ILC2s numbers in nasal mucosal tissue. Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression levels of GATA binding protein 3(GATA3), retinoic acid-related orphan receptor alpha (ROR- α), IL-33, ST2, IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP), myeloid differentiation primary-response protein 88 (MyD88), i IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4), and nuclear factor κ B p65 subunit (NF- κ B p65) in nasal mucosal tissue. Western blot was used to measure the protein expression levels of IL-33, ST2 and MyD88 in nasal mucosal tissue. **Results** Following OVA sensitization, nasal allergy symptom scores in the model group were significantly elevated compared to the control group ($\text{all} > 5$ points, $P < 0.001$), indicating successful modeling. After intervention, the nasal allergy symptom scores in the model group remained persistently high compared to the control group ($P < 0.001$). HE staining revealed disrupted nasal mucosal barrier and marked inflammatory response. Serum OVA-sIgE, IL-9 and IL-13 levels were significantly elevated ($P < 0.001$); the number of ILC2s in the nasal mucosa significantly increased ($P < 0.001$), with enhanced fluorescence intensities of ST2 and Thy1 ($P < 0.001$). GATA3, ROR- α , IL-33, ST2, IL-1RAcP, MyD88, IRAK4 and NF- κ B p65 mRNA expression levels were elevated ($P < 0.001$, $P < 0.01$), while IL-33, ST2 and MyD88 protein expression levels were increased ($P < 0.001$). Compared with the model group, both the electroacupuncture and western medicine groups showed a reversal of all the above indicators ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.05$); HE staining revealed reduced inflammatory infiltration in the nasal mucosa and improved tissue structural integrity. No statistically significant differences were observed between the electroacupuncture group and the western medicine group for any of the measured indicators. **Conclusion** Electroacupuncture at “Yingxiang-Hegu” (LI20-LI4) acupoints ameliorates OVA-induced nasal mucosal inflammatory changes in AR rats. This effect may be mediated by inhibiting the IL-33/ST2 signaling pathway and down-regulating ILC2s expression, thereby improving allergic rhinitis in rats. **【KEYWORDS】** Allergic rhinitis; Electroacupuncture; Pair of acupoints; Yingxiang-Hegu (LI20-LI4); IL-33/ST2; ILC2s

过敏性鼻炎(AR)是一种由免疫球蛋白E(IgE)介导的,针对环境过敏原的鼻黏膜慢性炎性反应疾病,其特征是鼻塞、流鼻涕、鼻痒、打喷嚏等,严重时可引起嗅觉减退^[1]。据流行病学统计^[2-3],AR累及全球约10%至40%的人口,中国患病率在不同地区差异很大,从华北北京的8.7%到西北乌鲁木齐的24.1%不等。AR不仅严重影响患者的生活质量、睡眠和工作学习效率^[4],还与哮喘、鼻窦炎等多种共病密切相关,构成了巨大的公共卫生负担^[5]。因此,

深入探究其发病机制并寻求更有效的干预策略具有重要意义。

AR的核心病理机制是2型炎症反应。既往研究多聚焦于适应性免疫中2型辅助T细胞(Th2)的主导作用。近年来先天免疫系统中的第2组先天淋巴细胞(ILC2s)被证实是2型细胞因子的另一重要来源,在炎症反应早期迅速应答,并与Th2细胞协同放大过敏反应,故被称为Th2的“镜像细胞”^[6-8]。当过敏原或物理损伤导致气道上皮细胞受损时会

释放警报素白细胞介素(IL)-33^[2],通过与其特异性受体生长刺激表达基因2蛋白(ST2)结合,会激活ILC2s,从而使ILC2s分泌大量Th2型细胞因子(如IL-5、IL-13),驱动2型炎症反应风暴,导致鼻塞、流涕等症状^[9]。因此,靶向IL-33/ST2轴以调控ILC2s的过度活化,为AR的治疗提供了新思路。

针灸治疗AR疗效确切,“国医大师”吕景山教授基于多年临床经验创立“针取对穴,意在精疏”对穴理论,其中针刺对穴迎香-合谷临床应用广泛,能显著改善AR患者症状并提升长期生活质量^[10]。本课题组前期研究证实,针刺该对穴可通过调节Th1/Th2平衡缓解卵清蛋白(OVA)诱导的AR模型大鼠的炎症反应^[11]。然而,该疗法是否及如何通过上述IL-33/ST2信号通路调控先天免疫核心细胞ILC2s,从而发挥治疗作用,目前尚不明确。近期,针灸科学研究联盟发布的纲领性文件《针灸科学研究行动计划》明确将“阐明针灸调节免疫等系统的生物学基础”与“深化针灸优势病种的疗效机制研究”列为核心战略方向^[12]。AR作为针灸优势病种,其先天免疫调控机制尚未明晰。本研究响应了上述研究倡议,从先天免疫新视角,探讨电针“迎香-合谷”对穴是否通过调控IL-33/ST2信号通路影响ILC2s活化,以揭示其治疗AR的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

48只SPF级SD大鼠,雌雄各半,体质量(180±20)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2024-0001。大鼠于山西中医药大学SPF级动物房中标准饲养,摄食饮水自由,环境温湿度条件分别为20~23℃和60%~70%。1周适应性喂养后开始正式实验,采用随机数字表法将大鼠分为空白组(12只)和造模组(36只)。造模结束后,将36只造模成功的大鼠随机分为模型组(12只)、西药组(12只)和电针组(12只)。本实验由山西中医药大学实验动物研究伦理委员会批准(审批编号:AWE202209144),实验所有操作严格遵守相关指导原则^[13]。

1.2 主要仪器和试剂

氯雷他定(10 mg×12片/盒,西安杨森),OVA(A5503-10G,美国Sigma-Aldrich),ELISA检测试剂盒[大鼠IL-9(MM-0172R1)、IL-13(MM-0085R1)、卵清蛋白特异性IgE(OVA-sIgE,MM-20974R1),江苏酶免],一抗ST2(ab194113)、山羊抗兔IgG H&L

[辣根过氧化物酶(HRP),ab205718]均购自英国Abcam,一抗髓样分化初级反应蛋白88(MyD88,32107)、IL-33(57041)、胸腺细胞抗原1(Thy1,又称CD90,48830)均购自美国SAB,一抗β-actin(AC026,武汉爱博泰克),山羊抗兔HRP(111-035-003,美国Jackson),山羊抗鼠HRP(SA00001-1,武汉三鹰),Alexa Fluor[®]488驴抗兔IgG(H+L,A21206,美国Thermo Fisher Scientific),苏木精-伊红(HE)染液(BP0211,湖北百奥斯)。

一次性无菌针灸针(0.25 mm×13 mm)、电针仪(SDZ-II)均购自苏州医疗用品厂,脱水机(TSJ-SD)、包埋机(BMJ-A)均购自常州中威,冻台(JB-L5,武汉俊杰),正置显微镜(CX-31)、荧光显微镜(BX53)均购自日本奥林巴斯,成像系统(NanoZoomer[®]S360,日本滨松),酶标仪(Sunrise,瑞士Tecan),病理切片机(SHANDON FINESSE 325)、荧光定量PCR仪(ABI QuantStudio 1)均购自美国Thermo Fisher Scientific,电泳仪(80310ES05,上海翌圣)。

1.3 造模方法

除空白组外,其余大鼠采用OVA致敏与鼻腔激发法建立过敏性鼻炎模型^[14-15],具体为:于第1~14天,腹腔注射含OVA(0.3 mg)和Al(OH)₃(30 mg)的混悬液进行基础致敏,隔日1次,共7次;于第15~21天,以5% OVA-0.9%氯化钠混悬液滴鼻(每侧50 μL)进行局部激发,每日1次,共7次。空白组以等量0.9%氯化钠溶液同步处理。在最后一次激发后30 min内,记录鼻部过敏症状评分,各指标采用叠加量化记分法,分数≥5分提示造模成功^[15],评分标准详见表1。(注:若大鼠在滴鼻过程中发生剧烈挣扎导致滴鼻不成功时,为了保证足够的造模所需剂量可待大鼠平静后再滴1次。)

1.4 干预方法

造模成功后进行分组,随后开始干预。

电针组:参照《实验针灸学》^[16]定位“迎香”“合谷”。抓取大鼠进行绑缚固定,双侧“迎香”斜刺进

表1 鼻部过敏症状评分标准

Table 1 Scoring criteria for nasal allergy symptoms

挠鼻	喷嚏	流涕	计分
无	无	无	0分
偶尔(1~5次)	1~3次	流至前鼻孔	1分
频繁(6~10次)	4~10次	流出前鼻孔	2分
抓不停(≥11次)	≥11次	涕流满面	3分

针,双侧“合谷”直刺进针,针刺后同侧穴位连接电针仪,予疏密波,频率2 Hz/100 Hz,电流强度1~2 mA,每次20 min,1次/d,共14 d。其余3组大鼠干预期间进行抓取和绑缚,1次/d,共14 d。

西药组:结合临床推荐用药剂量氯雷他定片10 mg/d,按体表面积法换算大鼠给药等效剂量^[17-18],予氯雷他定(0.1 mg/100 g)灌胃(1 mL/100 g),1次/d,共14 d。其余3组大鼠予等体积0.9%氯化钠溶液灌胃,1次/d,共14 d。为触发变态反应,电针组、西药组和模型组需进行模型维持^[11]:每次干预后30 min,以5% OVA-0.9%氯化钠混悬液滴鼻(每侧20 μL)进行激发;空白组以等量0.9%氯化钠溶液滴鼻。

1.5 观察指标及检测方法

鼻部过敏症状评分:于造模前后及最后1次干预结束后30 min内,按鼻部过敏症状评分标准(见表1),记录大鼠挠鼻、打喷嚏、流涕的频次,并进行评分,计算总评分。

取材:末次干预及行为学评分后,大鼠禁食12 h,腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉。经腹主动脉取血5~8 mL,静置离心后,取血清保存于-80℃冰箱,用于检测血清OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量。随后脱颈处死大鼠,迅速剥离双侧鼻黏膜组织。每组随机取6只大鼠的鼻黏膜,用4%多聚甲醛固定48 h,常规石蜡包埋后使用切片机制片(厚4 μm),展平烤片后保存,用于后续HE染色及免疫荧光检测;剩余6只大鼠的鼻黏膜组织则液氮速冻,后转移至-80℃保存,用于实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)及蛋白质印迹(Western blot)检测。

HE染色观察鼻黏膜组织病理形态改变:切片经梯度脱蜡与乙醇逐级脱水,流水冲洗1 min。苏木精染色4 min,流水冲洗至背景清澈。继而使用0.8%盐酸乙醇分化2 s,流水返蓝后水洗2 min。放入伊红染液染色20 s,经95%乙醇调色5 s,入无水乙醇中脱水。最后经环保透明剂透明、封片,于光学显微镜下观察鼻黏膜组织形态结构。

酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠血清OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量:每组随机取10只大鼠的血清样本,按照已购ELISA试剂盒说明书,往预包被96孔板中依次加入倍比稀释的血清样本、系列浓度标准品、HRP标记的检测抗体,经37℃水浴锅温育60 min并彻底洗涤。洗涤后加入TMB底物溶液避光显色,随后加入终止液终止反应。立即于450 nm波长下测定各孔吸光度值,根据标准曲线($R^2 >$

0.99)计算血清中OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量。

qPCR法检测大鼠鼻黏膜组织GATA结合蛋白3(GATA3)、维甲酸相关孤儿受体α(ROR-α)、IL-33、ST2、IL-1受体辅助蛋白(IL-1RAcP)、MyD88、IL-1受体相关激酶4(IRAK4)、核因子κB p65亚基(NF-κB p65)mRNA表达:取每组3只大鼠鼻黏膜组织30~50 mg,经液氮研磨后,采用TRIzol-氯仿法提取总RNA,氯仿-异丙醇分级分离并采用乙醇沉淀进行纯化,随后溶于DEPC水中。测定RNA浓度及纯度后,使用带有gDNA去除功能的反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA。以cDNA为模板,进行qPCR扩增。反应程序:95℃预变性3 min;95℃15 s,60℃30 s,共45个循环;最后行熔解曲线分析。以β-actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA相对表达量。引物序列见表2。

表2 引物序列
Table 2 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
GATA3	上游 CGTCACTTCTCTTGCAGCCTA	259
	下游 TTCTATCAGAGCTCGGCCATC	
ROR-α	上游 GGGATCAAACCCGAACCCAT	258
	下游 ACACAACCTGCCACATCACCT	
IL-33	上游 AAGGGCTCACTGCAGGAAAG	167
	下游 TTGTGATTTTGAAGGCGGG	
ST2	上游 AACTGGTGTGACCGACAAGG	239
	下游 CTGGCCAATAATCCCACGA	
IL-1RAcP	上游 CTGGTTGTCCTAAGCCCCAA	161
	下游 TTAGCCCCGCTTCAGCTCTTT	
MyD88	上游 TCCGTGGACTCCTACTTGTTTC	266
	下游 TCCTCACGGTCTAACAAGGC	
IRAK4	上游 CGGATCGCAGGCAATCTGAAG	150
	下游 TGACGGTGTCAAAGGCTTGC	
NF-κB p65	上游 AGCTCCTAAGGCACTGATGG	107
	下游 CAAAGAAGTTGGGGGCAGTT	
β-actin	上游 GAAGATCAAGATCATTTGCTCC	111
	下游 TACTCCTGCTTGCTGATCCA	

注:GATA3为GATA结合蛋白3,ROR-α为维甲酸相关孤儿受体α,IL-33为白细胞介素-33,ST2为生长刺激表达基因2蛋白,IL-1RAcP为白细胞介素-1受体辅助蛋白,MyD88为髓样分化初级反应蛋白88,IRAK4为白细胞介素-1受体相关激酶4,NF-κB p65为核因子κB p65亚基。

免疫荧光双染法检测大鼠鼻黏膜ST2、Thy1荧光强度及ILC2s数量;取每组3只大鼠切片经脱蜡、抗原修复及封闭后,4℃过夜,孵育一抗(兔抗ST2 1:1 000, TBST 稀释)。TBST 洗涤后,加入相应HRP 标记二抗(1:4 000)室温避光孵育45 min, TSA 染色放大荧光信号。洗脱,并重复封闭、4℃过夜,孵育一抗(兔抗Thy1 1:100, TBST 稀释)及荧光二抗(1:400)37℃孵育。DAPI染核、荧光封片后于显微镜下观察并采集图像。通过分析ST2与Thy1荧光信号的共定位情况,将双阳性细胞判定为ILC2s,并运用Image-Pro Plus软件进行细胞计数与荧光强度统计分析。

Western blot 法检测大鼠鼻黏膜组织IL-33、ST2、MyD88含量:取每组3只大鼠鼻黏膜组织30~50 mg,加入RIPA裂解液经研磨、离心提取总蛋白,BCA法测定浓度。蛋白样品经煮沸变性后,行SDS-PAGE电泳(浓缩胶75 V,分离胶100 V,至溴酚蓝达胶底缘)。电泳结束后,湿转法(300 mA 恒流,1.5 h)将蛋白转至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h。加入一抗(IL-33、ST2、MyD88均1:1 000, β -actin 1:50 000)4℃孵育过夜, TBST 洗膜后加入HRP 标记二抗(1:5 000)室温孵育1 h,再次洗膜。ECL 化学发光显影,天能曝光仪采集图像,Image J 软件分析条带灰度值,以 β -actin为内参分析各组蛋白条带。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.6 统计学方法

采用SPSS25.0软件进行数据统计分析,GraphPad Prism 9.0软件进行统计图作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布且方差齐,多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较用LSD检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

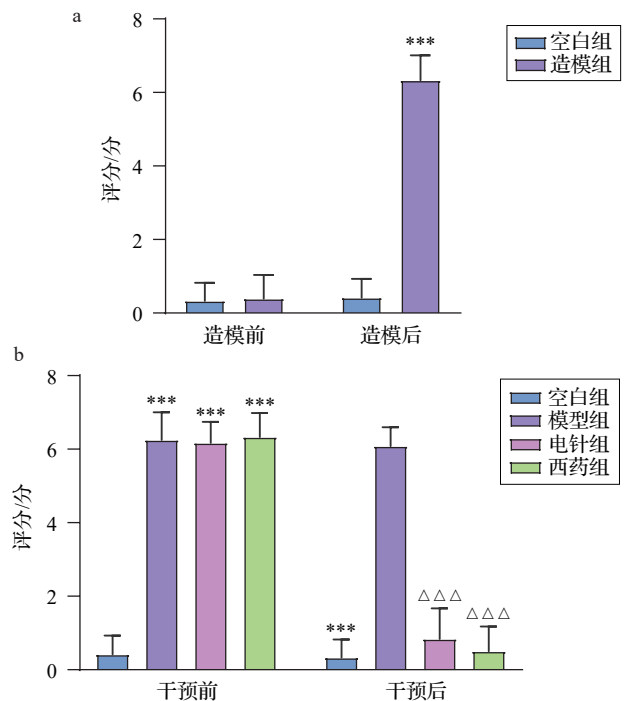
2.1 各组大鼠造模及干预前后鼻部过敏症状评分比较

造模前,各组大鼠均无明显喷嚏、流涕、挠鼻行为,症状总评分组间差异无统计学意义。造模后,除空白组外,其余各组均出现典型过敏性鼻炎症状,频繁喷嚏、流大量清水样涕及前后爪挠鼻,症状总评分 ≥ 5 分,提示造模成功(见图1a)。在造模成功后(干预前),模型组、电针组、西药组症状总评分显著高于空白组($P < 0.001$)。干预结束后,与空白

组比较,模型组仍有明显过敏症状,评分持续 ≥ 5 分($P < 0.001$);与模型组相比,电针组和西药组症状显著改善($P < 0.001$),仅偶见喷嚏或挠鼻,个别大鼠仍可见清水样涕流至前鼻孔周围;电针组与西药组间差异无统计学意义。见图1b。

2.2 各组大鼠鼻黏膜病理形态比较

空白组大鼠鼻黏膜结构完整,上皮层细胞排列整齐,纤毛密集呈“刷状缘”,杯状细胞散在分布(黏液空泡少);基底膜纤细、连续、均质;固有层致密有序,未见水肿、炎性浸润及毛细血管扩张,黏膜下层无水肿。与空白组相比,模型组大鼠鼻黏膜上皮层增厚,部分纤毛脱落、倒伏或断裂,杯状细胞增生,黏液空泡显著增多;基底膜局部断裂,上皮与固有层分离,呈波浪状或丝状纤维带;固有层局部充血肿胀,大量嗜酸性粒细胞浸润,黏液腺扩张。与模型组相比,电针组大鼠鼻黏膜上皮层恢复,纤毛排列整齐,杯状细胞数量接近正常;基底膜完整;固有层水肿减轻,纤维排列有序,嗜酸性粒细胞少,腺泡结构清晰。西药组大鼠鼻黏膜上皮层纤毛再生,排列较整齐,杯状细胞减少,黏液空泡数量下降;基底



注:a:造模阶段分值统计,b:干预阶段分值统计。与空白组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,△△△ $P < 0.001$ 。

图1 各组大鼠鼻部过敏症状总评分比较 ($\bar{x} \pm s$,造模组36只鼠,其余12只鼠/组)

Fig. 1 Comparison of total scores of nasal allergic symptoms among groups of rats

($\bar{x} \pm s$, 36 rats in the modeling group, the others 12 rats/group)

膜修复,连续性改善;固有层水肿减轻,纤维间隙缩小,嗜酸性粒细胞浸润减少,充血缓解,腺体增生受抑制。见图2。

2.3 各组大鼠血清OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量比较

与空白组相比,模型组大鼠血清中的OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量升高($P<0.001$);与模型组相比,电针组和西药组大鼠血清中OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量下降($P<0.01, P<0.001$)。见图3。

2.4 各组大鼠鼻黏膜组织GATA3、ROR- α 、IL-33、ST2、IL-1RAcP、MyD88、IRAK4、NF- κ B p65 mRNA表达比较

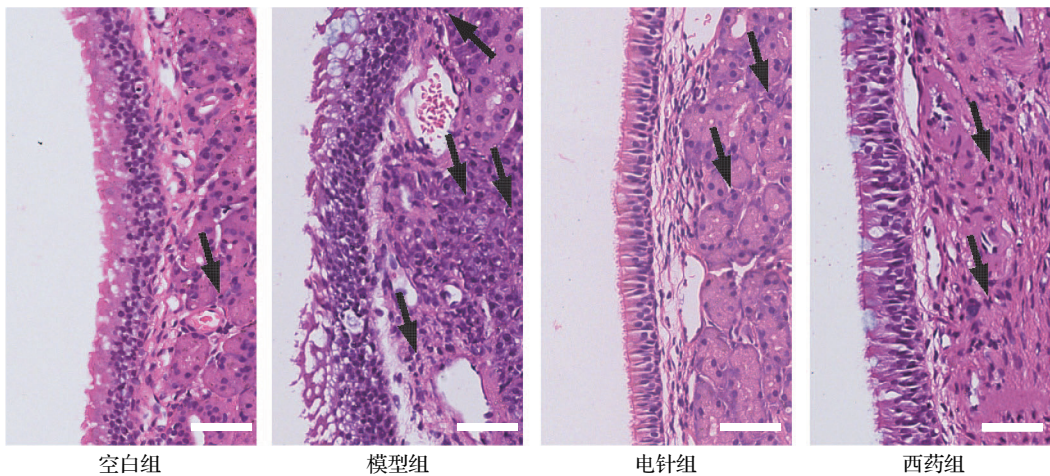
与空白组相比,模型组大鼠鼻黏膜组织中GATA3、ROR- α 、IL-33、ST2、IL-1RAcP、MyD88、IRAK4、NF- κ B p65 mRNA表达水平显著升高($P<0.001, P<0.01$);与模型组相比,电针组和西药组大鼠鼻黏膜组织中GATA3、ROR- α 、IL-33、ST2、IL-1RAcP、MyD88、IRAK4、NF- κ B p65 mRNA表达水平下调($P<0.001, P<0.01, P<0.05$)。见图4。

2.5 各组大鼠鼻黏膜组织ST2、Thy1(CD90)阳性表达及ILC2s数量比较

与空白组相比,模型组鼻黏膜组织ST2和Thy1的荧光强度升高($P<0.001$);与模型组相比,电针组和西药组鼻黏膜组织ST2和Thy1的荧光强度降低($P<0.001, P<0.01$)。ILC2s是2型炎症反应的关键始动细胞,通过免疫荧光双标法(ST2⁺Thy1⁺)可检测鼻黏膜中ILC2s的数量^[19]。图5可见,与空白组相比,模型组鼻黏膜中的ILC2s数量显著增加($P<0.001$);与模型组相比,电针组和西药组的ILC2s数量显著减少($P<0.001$)。

2.6 各组大鼠鼻黏膜组织IL-33、ST2、MyD88蛋白表达比较

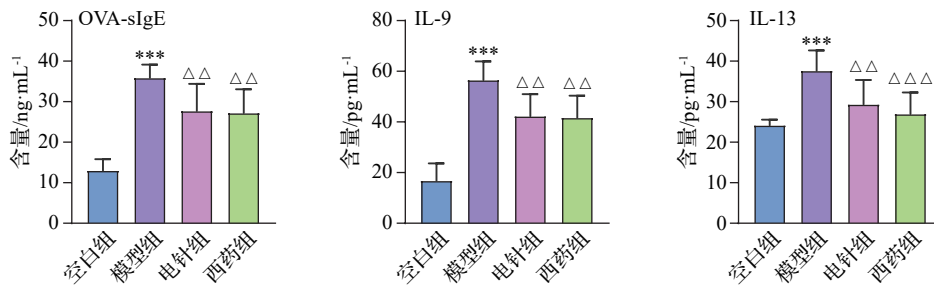
与空白组比较,模型组大鼠鼻黏膜组织中IL-33、ST2、MyD88蛋白表达显著升高($P<0.001$);与模型组相比,电针组和西药组大鼠鼻黏膜组织中IL-33、ST2、MyD88蛋白表达显著降低($P<0.01, P<0.001, P<0.05$)。见图6。



注:黑色箭头为嗜酸性粒细胞,标尺=50 μ m。

图2 各组大鼠鼻黏膜组织病理学变化(HE染色)

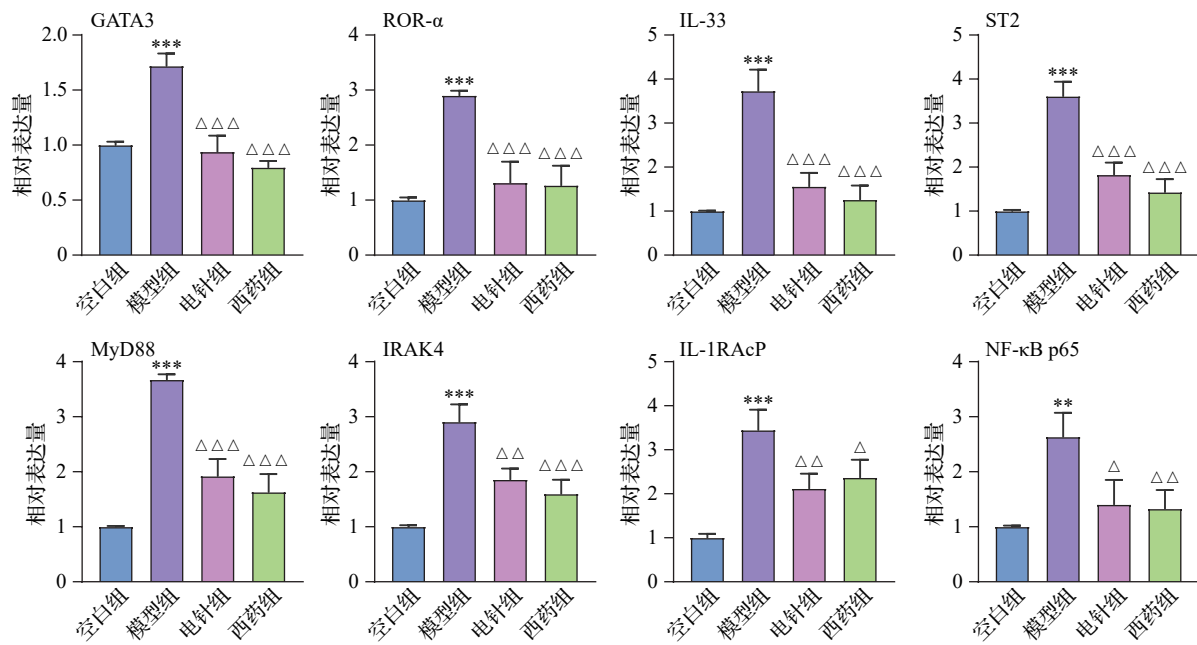
Fig. 2 Histopathological changes in nasal mucosa tissue of rats in the 4 groups(HE staining)



注:OVA-sIgE为卵清蛋白特异性免疫球蛋白E,IL-9为白细胞介素-9,IL-13为白细胞介素-13。与空白组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较,△△ $P<0.01, \triangle\triangle\triangle P<0.001$ 。

图3 各组大鼠血清OVA-sIgE、IL-9、IL-13含量比较($\bar{x}\pm s, 10$ 只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of serum OVA-sIgE, IL-9 and IL-13 contents of rats in the 4 groups ($\bar{x}\pm s, 10$ rats/group)



注:GATA3为GATA结合蛋白3,ROR- α 为维甲酸相关孤儿受体 α ,IL-33为白细胞介素-33,ST2为生长刺激表达基因2蛋白,MyD88为髓样分化初级反应蛋白88,IRAK4为白细胞介素-1受体相关激酶4,IL-1RAcP为白细胞介素-1受体辅助蛋白,NF- κ B p65为核因子 κ B p65亚基。与空白组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ 。

图4 各组大鼠鼻黏膜GATA3和ROR- α 及IL-33/ST2信号通路各指标mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of mRNA expression levels of GATA3, ROR- α , and markers of the IL-33/ST2 signaling pathway in the nasal mucosa of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

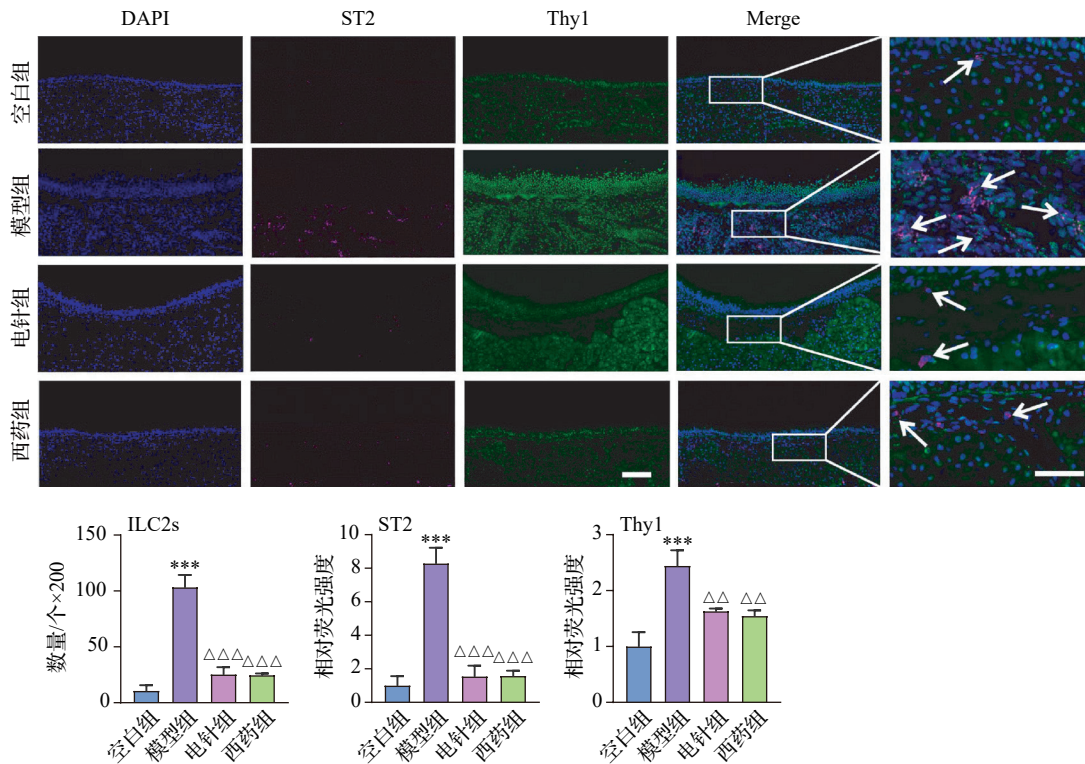
3 讨论

AR归为中医学“鼻鼽”范畴。“国医大师”吕景山教授经多年临床实践发现,针刺对穴迎香-合谷治疗AR疗效显著,且复发率低,能有效提高患者治疗后的生活质量^[10]。迎香为手阳明大肠经循行过鼻翼外的腧穴,主治鼻塞、鼽衄等鼻病;同时,因大肠与肺相表里,迎香亦能行养肺固涕之效。研究表明^[20],迎香穴位埋线可改善AR大鼠黏膜屏障功能。合谷为手阳明大肠经之原穴,功擅疏风解表、宣通鼻窍,治疗面部官窍疾患可获良效^[21]。《针灸大成》强调“合谷主伤寒发热,头痛脊强……鼻衄鼻渊”,印证其鼻病主治功效。迎香以疏调局部经气为主,合谷以宣通经络之气为要,二穴相合,使得近端取穴与远部取穴相结合,通经接气,开窍启闭益彰^[22];两穴在功能上具有开合相济、动静相随、升降相成的特点,少而精的取穴还能达到专一而效力宏大的效果^[23]。本研究结果显示,电针对穴“迎香-合谷”能显著降低OVA诱导的AR大鼠模型的鼻部过敏症状评分(挠鼻、喷嚏、流涕);HE染色观察到,电针干预可改善鼻黏膜组织病理损伤,减轻嗜酸性粒细胞浸润;进一步血清学检测显示,AR大鼠升高的OVA-sIgE水平经电针或西药干预后均下调。这些结果共同表

明,电针对穴“迎香-合谷”对AR的鼻部过敏症状及相关免疫炎症反应均具有明显的改善作用。

AR的核心发病机制与2型炎症反应密切相关,其中Th2与ILC2s构成2型炎症反应的核心协调轴^[2,24]。Th2属于适应性免疫细胞,其活化依赖抗原呈递;而ILC2s属于先天免疫细胞,无需抗原特异性信号激活,可早期快速响应启动2型免疫^[19,25]。两者可通过分泌的细胞因子形成双向正反馈调节,共同放大并维持过敏性炎症反应^[26-27]。

在变应原刺激下,受损的鼻黏膜上皮细胞会释放“警报素”IL-33,从而激活IL-33/ST2信号通路,促进ILC2s活化^[28]。具体而言,IL-33与ILC2s表面高表达的受体ST2特异性结合^[29],进而激活ILC2s^[30]。本研究结果显示,电针组及西药组大鼠鼻黏膜中IL-33、ST2的mRNA及蛋白表达水平均下调。阳性对照药氯雷他定作为公认标准的抗过敏性疾病治疗药物,能通过抑制IL-33/ST2的表达来降低血清总IgE含量发挥治疗作用^[31]。本研究电针干预对上述指标产生了类似的改善作用,提示电针同样可能抑制该通路上游上皮细胞IL-33的释放及其与ILC2s表面ST2受体的结合,干预通路的上游环节。

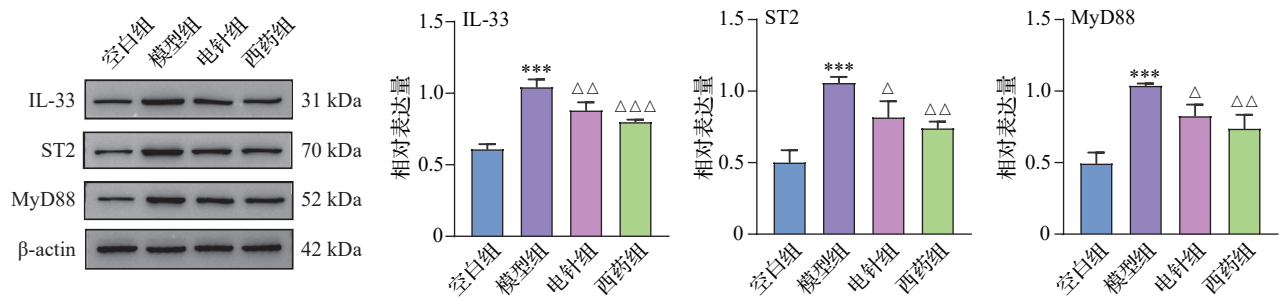


注: ILC2s 为第 2 组先天淋巴细胞, ST2 为生长刺激表达基因 2 蛋白, Thy1 为胸腺细胞抗原 1。免疫荧光图片左侧 4 列为同一标尺, 标尺 = 100 μm; 右侧一列为左侧免疫荧光双标 (ST2⁺Thy1⁺, 代表 ILC2s) 方框部位的放大图, 标尺 = 50 μm, 箭头示 ILC2s 阳性细胞。与空白组比较, ***P < 0.001; 与模型组比较, △△P < 0.01, △△△P < 0.001。

(免疫荧光染色, $\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

图 5 各组大鼠鼻黏膜中 ST2、Thy1 的相对荧光强度及 ILC2s 数量比较

Fig. 5 Comparison of the relative fluorescence intensities of ST2 and Thy1, and the number of ILC2s in the nasal mucosa of rats in the 4 groups (immunofluorescence staining, $\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



注: IL-33 为白细胞介素-33, ST2 为生长刺激表达基因 2 蛋白, MyD88 为髓样分化初级反应蛋白 88。与空白组比较, ***P < 0.001; 与模型组比较, △P < 0.05, △△P < 0.01, △△△P < 0.001。

($\bar{x} \pm s$, 3 只鼠/组)

图 6 各组大鼠鼻黏膜组织 IL-33/ST2 信号通路中代表性指标的蛋白表达比较

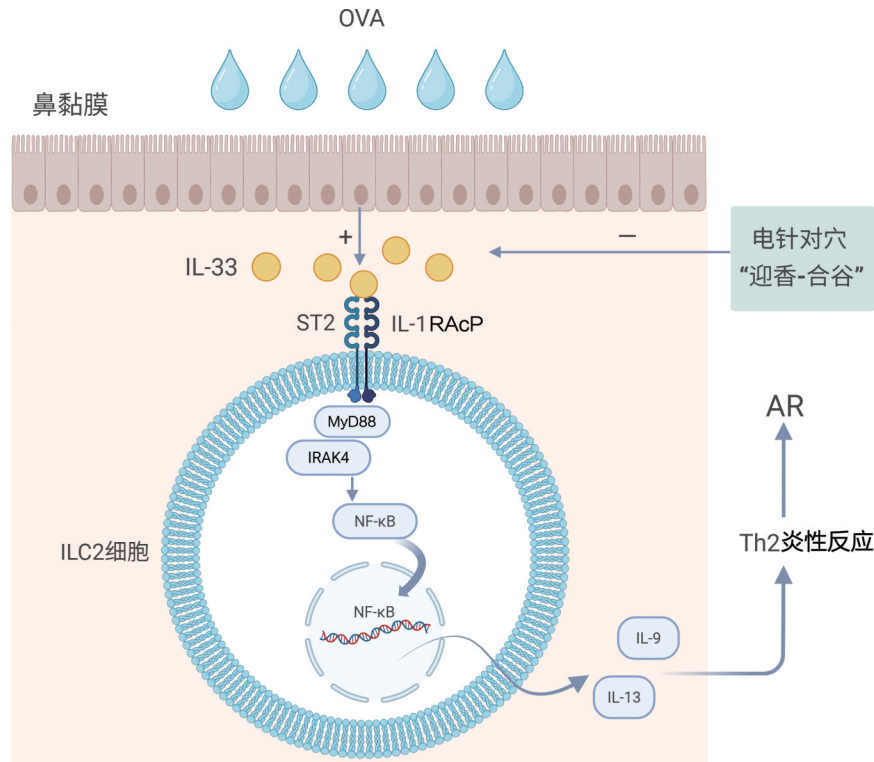
Fig. 6 Comparison of the protein expression levels of representative indexes in the IL-33/ST2 signaling pathway in the nasal mucosa tissue of rats in the 4 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

ILC2s 激活后, IL-33、ST2 与募集的胞内 IL-1RAcP 组成异二聚体复合物, 进一步招募并激活下游接头蛋白 MyD88, 活化 IRAK4, 最终推动 NF-κB p65 活化并进入细胞核, 促进下游靶基因转录^[32](见图 7)。同时, IL-33 激活 ILC2s 后, 上调其分

化与功能关键转录因子 GATA3 和 ROR-α, 进一步增强 ILC2s 的活化增殖能力^[25, 33-34]; 而活化的 ILC2s 会大量分泌 IL-9、IL-13 等 2 型效应细胞因子, 最终加剧 IgE 升高、鼻黏膜嗜酸性粒细胞浸润及黏液过度分泌等炎性损伤^[35-37]。本研究通过 ST2⁺Thy1⁺免

疫荧光双标证实,电针或氯雷他定干预均可减少鼻黏膜中 ILC2s 的数量;同时,电针或氯雷他定干预后信号通路胞内关键分子 MyD88、IRAK4、NF-κB p65 的 mRNA 表达及 MyD88 的蛋白表达均降低,且 ILC2s 关键转录因子 GATA3、ROR-α 的 mRNA 表达同步下调。这表明电针可进一步阻断 IL-33/ST2

结合后的 MyD88/IRAK4/NF-κB p65 胞内信号传导,抑制 ILC2s 的活化与增殖。相应地,随着 ILC2s 功能被抑制,其分泌的 IL-9、IL-13 等 2 型效应细胞因子水平亦降低,因而取得大鼠鼻黏膜嗜酸性粒细胞募集减少、黏液分泌过度得到改善等炎症缓解效应。



注:OVA为卵清蛋白,AR为过敏性鼻炎,IL为白细胞介素,ST2为生长刺激表达基因2蛋白,ILC2为第2组先天淋巴细胞,IL-1RAcP为白细胞介素-1受体辅助蛋白,MyD88为髓样分化初级反应蛋白88,IRAK4为白细胞介素-1受体相关激酶4,NF-κB为核因子κB,Th2为辅助性T细胞2。

图7 电针对穴“迎香-合谷”对OVA诱导的AR大鼠作用示意图

Fig. 7 Schematic diagram of the anti-allergic effect of electroacupuncture at “Yingxiang-Hegu”(LI20- LI4) acupoints in ovalbumin (OVA)-induced allergic rhinitis (AR) rats

综上所述,基于“国医大师”吕景山教授对穴理论的电针“迎香-合谷”可以改善AR大鼠的过敏症状及鼻黏膜病理损伤,其机制可能与抑制鼻黏膜IL-33/ST2信号轴,减少ILC2s的活化,进一步阻断下游MyD88/IRAK4/NF-κB p65通路的传导,最终减少效应因子IL-9、IL-13的释放有关。然而,上皮细胞释放IL-33的具体调控靶点尚不明确,未来研究可聚焦该点,深入挖掘上游靶点,进一步探索电针调控IL-33/ST2信号通路的上游分子机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。

参考文献

[1] 顾瑜蓉,李华斌.《中国变应性鼻炎诊断和治疗指南(2022年,修订版)》解读[J].中国眼耳鼻喉科杂志,2022,22(2):

209-211.

Gu Y R, Li H B. Interpretation of Chinese guideline for diagnosis and treatment of allergic rhinitis(2022, revision) (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, 2022, 22(2): 209-211.

[2] Wise S K, Lin S Y, Toskala E. International consensus statement on allergy and rhinology: allergic rhinitis: executive summary[J]. Int Forum Allergy Rhinol, 2018, 8(2): 85-107.

[3] Hou X Q, Luo W T, Wu L T, et al. Associations of four sensitization patterns revealed by Latent Class Analysis with clinical symptoms: a multi-center study of China [J]. EClinicalMedicine, 2022, 46: 101349.

[4] Sekine Y, Watanabe K, Horiguchi H, et al. Association between allergic rhinitis and work productivity in a nonclinical setting: a cross-sectional study[J]. J Occup Health, 2026, 68(1): uiaf071.

- [5] Rădeanu D G, Bronescu V, Stan C, et al. Chronic rhinosinusitis: a multifaceted burden on patients and society: a systematic review[J]. *Surgeries*, 2025, 6(3): 48.
- [6] Cheng H, Jin C Y, Wu J, et al. Guards at the gate: physiological and pathological roles of tissue-resident innate lymphoid cells in the lung[J]. *Protein Cell*, 2017, 8(12): 878-895.
- [7] Moro K, Yamada T, Tanabe M, et al. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+) Sca-1(+) lymphoid cells[J]. *Nature*, 2010, 463(7280): 540-544.
- [8] Bao K F, Gu X Q, Song Y J, et al. TCF-1 and TOX regulate the memory formation of intestinal group 2 innate lymphoid cells in asthma[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7850.
- [9] Dong Y J, Zhong J X, Dong L L. IL-33 in rheumatic diseases[J]. *Front Med*, 2021, 8: 739489.
- [10] 杜倩钰, 吕玉娥. 施今墨对药结合吕景山对穴治疗过敏性鼻炎验案[J]. *内蒙古中医药*, 2021, 40(4): 72-73.
Du Q Y, Lü Y E. Shi Jinmo's experience in treating allergic rhinitis by combining medicine with Lü Jingshan's acupoint therapy (in Chinese) [J]. *Inner Mongolia Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 40(4): 72-73.
- [11] 胡情, 苏嘉琪, 楼金成, 等. 针刺对穴“迎香-合谷”对变应性鼻炎大鼠 Th1、Th2 细胞因子及转录因子 T-bet/GATA-3 的影响[J]. *海南医学院学报*, 2023, 29(15): 1135-1143.
Hu Q, Su J Q, Lou J C, et al. Effect of acupuncture on acupoint “Yingxiang-Hegu” on Th1, Th2 cytokines and T-bet/GATA-3 of allergic rhinitis rats (in Chinese) [J]. *Journal of Hainan Medical University*, 2023, 29(15): 1135-1143.
- [12] 针灸科学研究联盟. 针灸科学研究行动计划[J]. *针刺研究*, 2025, 50(1): 1-2.
Acupuncture Scientific Research Alliance. A plan for acupuncture-moxibustion scientific research (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2025, 50(1): 1-2.
- [13] 《针刺研究》编辑部. 《针刺研究》实验动物福利伦理审查清单[J]. *针刺研究*, 2024, 49(2): 220.
Editorial Department of Acupuncture Research. Review list of welfare ethics of experimental animals in *Acupuncture Research* (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2024, 49(2): 220.
- [14] 刘宝, 黄翔明, 王丹丹, 等. 变应性鼻炎病证结合模型的构建与评价[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(10): 4952-4956.
Liu B, Huang X M, Wang D D, et al. Establishment and evaluation of the combination with disease and syndrome model of allergic rhinitis (in Chinese) [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2020, 35(10): 4952-4956.
- [15] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 变应性鼻炎动物模型制备规范(草案)[J]. *中草药*, 2018, 49(1): 50-57.
The Chinese Medicine Pharmacology Experiment Professional Committee of China Association of Chinese Medicine. Specification for preparation of allergic rhinitis animal model (draft) (in Chinese) [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(1): 50-57.
- [16] 余曙光, 徐斌. 实验针灸学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
Yu S G, Xu B. *Experimental acupunctureology* (in Chinese) [M]. 2nd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1261-1264.
Chen Q. *Research methods in pharmacology of Chinese materia Medica* (in Chinese) [M]. 3rd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 1261-1264.
- [18] 李记泉, 李思佳, 王列, 等. 预电针调控瞬时受体电位通道相关蛋白防治荨麻疹的机制研究[J]. *针刺研究*, 2023, 48(3): 274-280.
Li J Q, Li S J, Wang L, et al. Electroacupuncture preconditioning relieves cutaneous passive anaphylaxis by down-regulating IP3 mediated ROS/TRPM2 signaling pathway and inhibiting mast cell degranulation in rats with urticaria (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(3): 274-280.
- [19] Cao Y J, Li Y, Wang X Y, et al. Dopamine inhibits group 2 innate lymphoid cell-driven allergic lung inflammation by dampening mitochondrial activity [J]. *Immunity*, 2023, 56(5): 1148-1151.
- [20] Xiang F, Zhang H, Jing R, et al. Yingxiang acupoint embedding improves mucosal barrier function in rats with local allergic rhinitis [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2024, 185(8): 739-751.
- [21] 陆晋贤, 宋全枚, 张学成, 等. 针灸治疗变应性鼻炎选穴规律探析与疗效评价[J]. *针刺研究*, 2023, 48(1): 44-52.
Lu J X, Song Q M, Zhang X C, et al. Analysis of acupoints selection rules and efficacy evaluation of acupuncture and moxibustion for allergic rhinitis (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(1): 44-52.
- [22] 吕玉娥. 国医大师吕景山对穴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
Lü Y E. *Master of traditional Chinese medicine Lü Jingshan's pair-acupoints* (in Chinese) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2019.
- [23] 吕玉娥, 黄安, 陈洪, 等. 针药并用, 继承创新: 国医大师吕景山[J]. *环球中医药*, 2025, 18(1): 45-50.
Lü Y E, Huang A, Chen H, et al. Combination of acupuncture and medicine, inheritance and innovation: Lü Jingshan, master of traditional Chinese medicine (in Chinese) [J]. *Global Traditional Chinese Medicine*, 2025, 18(1): 45-50.
- [24] 张亚光, 孙兵. 二型免疫细胞(Th2/ILC2)在肺部过敏性炎症中作用机制的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(1): 11-20.
Zhang Y G, Sun B. Progress on mechanism of type II immune cells(Th2/ILC2) in allergic pulmonary inflammation (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2024, 40(1): 11-20.

- [25] Fleming D S, Liu F, Urban J F, et al. Type 2 innate lymphoid cell (Ilc2) -deficient mice are transcriptionally constrained during *Nippostrongylus brasiliensis* infection [J]. *Pathogens*, 2025, 14(6): 571.
- [26] Sadik S, Lu Y H, Zhu S X, et al. Group 2 innate lymphoid cells (ILC2s): the spotlight in asthma pathogenesis and lung tissue injury [J]. *Allergol Immunopathol*, 2021, 49 (2) : 208-216.
- [27] Piehler D, Eschke M, Schulze B, et al. The IL-33 receptor (ST2) regulates early IL-13 production in fungus-induced allergic airway inflammation [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9 (4): 937-949.
- [28] Li Y Q, Zhong Y, Xiao X P, et al. IL-33/ST2 axis promotes the inflammatory response of nasal mucosal epithelial cells through inducing the ERK1/2 pathway [J]. *Innate Immun*, 2020, 26(6): 505-513.
- [29] Borghi S M, Carvalho T T, Bertozzi M M, et al. Role of the interleukin-33 (IL-33)/suppressor of tumorigenicity 2 (ST2) signaling in superoxide anion-triggered inflammation and pain behavior in mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2025, 413: 111476.
- [30] Topczewska P M, Rompe Z A, Jakob M O, et al. ILC2 require cell-intrinsic ST2 signals to promote type 2 immune responses [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1130933.
- [31] 刘思佳, 刘军彤, 李记泉, 等. 针刺预处理“曲池”“血海”对荨麻疹大鼠肥大细胞及白细胞介素-33、肿瘤抑制素2表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 311-316, 324.
Liu S J, Liu J T, Li J Q, et al. Effect of acupuncture pretreatment of “Quchi” (LI11) and “Xuehai” (SP10) on mast cells and IL-33/ST2 in rats with urticaria (in Chinese) [J]. *Acupuncture Research*, 2023, 48(4): 311-316, 324.
- [32] Olsthoorn S E M, van Krimpen A, Hendriks R W, et al. Chronic inflammation in asthma: looking beyond the Th2 cell [J]. *Immunol Rev*, 2025, 330(1): e70010.
- [33] Kasal D N, Liang Z T, Hollinger M K, et al. A Gata3 enhancer necessary for ILC2 development and function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(32): 1-12.
- [34] Klose C S N, Artis D. Innate lymphoid cells control signaling circuits to regulate tissue-specific immunity [J]. *Cell Res*, 2020, 30(6): 475-491.
- [35] Olguin-Martinez E, Muñoz-Paleta O, Ruiz-Medina B E, et al. IL-33 and the PKA pathway regulate ILC2 populations expressing IL-9 and ST2 [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 787713.
- [36] Halim T Y, Krauss R H, Sun A C, et al. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation [J]. *Immunity*, 2012, 36 (3): 451-463.
- [37] Ogulur I, Mitamura Y, Yazici D, et al. Type 2 immunity in allergic diseases [J]. *Cell Mol Immunol*, 2025, 22 (3) : 211-242.

收稿日期:2025-11-11 修回日期:2025-12-31